

JP 5103670 A 6 C12N-009/64
JP 3213985 B2 6 C12N-009/64 Previous Publ. patent JP 5103670

Abstract (Basic): JP 5103670 A

New protein has the following physiochemical properties is 1) mol. wt. by SDS-polyacrylamide electrophoresis of ca. 34,000-ca 38,000 Dalton and 2) having protease activity which breaks human hepatocyte growth factor comprising 728 aminoacid residues specifically at a position between alginin, the 494th aminoacid from its amino terminal, and valine, the 495th aminoacid from its amino terminal. The protein may have the partial aminoacid sequence (I).

USE - The protein breaks human hepatocyte growth factor (hHGF) at a specific position to modify the single stranded form into duplex stranded form and the protein is useful for controlling activity of hHGF in vitro and is used on non-serum culture or prepn. of duplex hHGF in test tube.

In an example protein is purified of foeta bovine serum and aminoacid sequence analysis.

Dwg.0/1

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-009/64

International Patent Class (Additional): A61K-037/54; C07K-007/06;

C07K-099-00

?logoff

14jan02 21:42:05 User382308 Session D3721.2

\$6.11 0.205 DialUnits File352

\$5.09 1 Type(s) in Format 7

\$5.09 1 Types

\$11.20 Estimated cost File352

KMKNET3 0.016 Hrs.

\$11.20 Estimated cost this search

\$11.47 Estimated total session cost 0.283 DialUnits

Logoff: level 01.12.27 D 21:42:05

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-103670

(43)公開日 平成5年(1993)4月27日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
|--------------------------|---------|-----------|----|--------|
| C 1 2 N 9/64 | | Z 7823-4B | | |
| // A 6 1 K 37/54 | A E D | 8314-4C | | |
| C 0 7 K 7/06 | Z N A Z | 8318-4H | | |
| C 0 7 K 99:00 | | | | |

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)

| | | | |
|----------|------------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平3-271362 | (71)出願人 | 000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 |
| (22)出願日 | 平成3年(1991)10月18日 | (72)発明者 | 下村 猛 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内 |
| | | (72)発明者 | 森本 裕紀 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 長谷川 一 (外1名) |

(54)【発明の名称】 新規なタンパク質

(57)【要約】

【構成】 CHO細胞を用いた組換えヒト肝細胞増殖因子(hHGF)の生産において、1本鎖(不活性)型hHGFを2本鎖(活性)型hHGFに変換する能力を有する蛋白質を精製、単離し、分子量(約34,000~約38,000)及びN末端部分アミノ酸配列を決定した。

【効果】 本願蛋白質は、in vivoまたはin vitroでのhHGFの活性調節因子として、また2本鎖hHGFを無血清培養時や試験管内で調製するために用いられる。

24

のアミノ末端から494番目のアミノ酸であるアルギニンと495番目のアミノ酸であるバリンとの間で特異的に切断するプロテアーゼ活性を有する。

【請求項2】 下記の部分アミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1記載のタンパク質。

Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu

1

5

明を完成するに至った。

【0006】即ち、本発明の要旨は、下記の理化学的性質を有することを特徴とする新規なタンパク質に存する。

■ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約34,000~約38,000ダルトンである。

■ 7.2.8 アミノ酸残基より成るヒト肝細胞増殖因子をそのアミノ末端から494番目のアミノ酸であるアルギニ

ンと495番目のアミノ酸であるバリンとの間で特異的に切断するプロテアーゼ活性を有する。

【0007】本タンパク質を無血清培養下のhHGF生産時に適量添加することにより、ほぼ100%2本鎖のhHGFを得ることができ、また、試験管内で本タンパク質を作用させると、1本鎖hHGFを2本鎖hHGFに変えることができる。本発明をさらに詳細に説明するに、本発明のプロテアーゼ活性を有する新規なタンパク質は、以下のような精製段階を経ることにより得られる。例えば健康人より採血した血液を、ガラス容器中、冷蔵庫内で、一晚放置後、生じた血塊と細胞を遠心分離により除去後、0.4 μ mの目のフィルターでろ過したヒト血清、又は、市販の種々の動物血清(Gibco社製のウシ胎児血清、IrvineScientific社製のウシ血清、ウマ血清、ブタ血清等)を材料とする。これら血清を水で1.5~2倍に希釈後、Heprins-Sepharoseカラム(ファルマシア社製等)等に供する。そのカラムクロマトグラフィーより得られた当該タンパク質を含むフラクションを疎水クロマトグラフィー(たとえば、ファルマシア社製Phenyl-Sepharoseカラム等)にかける。得られた当該タンパク質を含むフラクションをAprotinin固定化アフィニティーカラム(ボクタファーム社製等)に供し、その後で、セルろ過カラムクロマトグラフィー(旭化成社製GS520等)で処理することによ

30

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトHGF (hHGF) 遺伝子を組み込んだCHOの細胞を無血清培地で培養して、hHGFを産生させることを試みた。5～10%の血清存在下では、すべてのhHGFは2本鎖型の型をとっていたが、無血清培養下で産生されたhHGFの大半は、1本鎖型のhHGFであり、約20～30%のみが2本鎖hHGFであった。hHGFの生理活性は、*in vitro*実験において1本鎖では見られず、2本鎖になった場合に発現することが知られている。

1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* were determined by the method of Lichtenthaler and Whistler (1973).

[illegible]

を有する。また、本発明のタンパク質を、還元カルボキシメチル化処理後、逆相カラムクロマトグラフィー（ワイエムシー社製YMC pack C4カラム等）で処理することにより得られる主要なペプチドは配列番号：1に記載のN末端アミノ酸配列を含む。

【0009】

【発明の効果】本発明に係わるプロテアーゼ活性を有するタンパク質は1本鎖hHGFを活性型の2本鎖hHGFに変換する能力を持つため、*in vivo*または*in vitro*でのhHGFの活性の調節因子として、また2本鎖hHGFを無血清培養時や試験管内で調製するために使用される。

【0010】

【実施例】以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例1（ウシ胎児血清を用いての当該タンパク質の精製とアミノ酸配列解析）

ウシ胎児血清（Gibco社製）を水で1.5倍に希釈し、それをHeparin-sepharoseカラム（ファルマシア社製：1.5倍に水で希釈されたダルベッコのPBSで平衡化されている）に添加し、緩衝液A（10mM NaH₂PO₄・Na₂HPO₄バッファー、pH7.0, 0.1M NaCl含）で洗浄後、この緩衝液Aと緩衝液B（10mM NaH₂PO₄・Na₂HPO₄バッファー、pH7.0, 0.7M NaCl含）を用いて、NaCl濃度0.1Mから0.7Mの濃度勾配溶出を行った。そして、1本鎖hHGFを2本鎖hHGFに変換するプロテアーゼ活性が存在する画分

（約300～450mM NaCl画分）を回収した。この画分を、2M硫酸アンモニウムと等量混合後、1M硫酸アンモニウムで平衡化されたPhenyl-sepharoseカラム（ファルマシア社製）に添加した。1M硫酸アンモニウムで洗浄後、硫酸アンモニウム1Mから0Mまでの濃度勾配溶出を行い、1本鎖hHGFを2本鎖hHGFに変換するプロテアーゼ活性が存在する画分（約600～400mM硫酸アンモニウム画分）を回収した。当画分を緩衝液C（300mM NaCl, 50mM Tris/HCl, pH8.0）に一晩透析後、緩衝液Cで平衡化したAprotinin固定化カラム（ペクタファーム社製）に添加した。緩衝液Cで洗浄後、緩

HCl, pH8.0）で中和後、限外ろ過膜で濃縮した。この濃縮液を、緩衝液Cを用いて0.5ml/minの流速で平衡化したGS520カラム（旭化成社製）に添加した。分子量約36,000ダルトンの位置のピークを分取し、この標品を用いて以下に述べるアミノ酸配列の解析を行った。

【0011】尚、上記の各精製工程において、後述実施例3に記載の方法で、1本鎖hHGFを2本鎖hHGFに変換する活性を指標として、分画精製した。上記の精製されたプロテアーゼ活性を有するタンパク質を、緩衝液F（6M塩酸グアニジン, 0.002Mエチレンジアミン4酢酸塩, 1Mトリス塩酸バッファー, pH8.5）中で、2-メルカプトエタノールにより、40℃、2時間還元した後、等濃度のモノクロード酢酸を加え、窒素ガス下、室温、遮光下で1時間反応させ、カルボキシメチル化を行った。反応後、YMC pack C4カラム（ワイエムシー社製）に添加し、アセトニトリル/イソプロピルアルコール（3/7）濃度10%から70%まで30分間の濃度勾配溶出を行い、1本の主要なピークを分取した。このピークを真空状態で乾燥した後、50%TFA（トリフルオロ酢酸）60μlに溶解し、ポリブレン処理したガラスフィルターに添加し、Applied Biosystems社製470Aシーケンサーでエドマン分解し、N末端域のアミノ酸配列を決定した。フェニルチオヒダントイン（PTH）アミノ酸の同定は、三菱化成社製“MC1-gel ODS 1HU”（0.46×15cm）カラムを用い、酢酸緩衝液（10mM酢酸緩衝液, pH4.7, 0.01%SDS, 38%アセトニトリル）による単一溶媒溶出法を流速1.2ml/min、温度43℃で行い、PTHアミノ酸の検出は269nmの吸光度で行った。

【0012】この結果、還元カルボキシメチル化されたこのタンパク質から得られる1つのペプチドのN末端アミノ酸配列は、後述の配列番号：1に示すようであった。また、還元カルボキシメチル化せずに、当該タンパク質をYMC pack C4カラムに添加し、アセトニトリル/イソプロピルアルコール（3/7）濃度10%から70%まで30分間の濃度勾配溶出を行い、1本のピークを分取した。このピークを真空状態で乾燥した後、同様にN末端域のアミノ酸配列を分析した。この結果、カルボキシメチル化されたペプチドから得られたN

Ile-Gln-Pro-Pro-Xaa-Xaa-Gln-Ala
(Xaaは未同定のアミノ酸)

と一致した。このことから、このタンパク質は、N末端から順にIle-Gln-Pro-Pro-Xaa-Xaa-Gln-Alaの配列を有するタンパク質であると推定された。

【0013】実施例2（ウシ胎児血清からの精製）

【0014】このタンパク質の精製は、

（1）ウシ胎児血清（Gibco社製）を水で1.5倍に希釈し、それをHeparin-sepharoseカラム（ファルマシア社製：1.5倍に水で希釈されたダルベッコのPBSで平衡化されている）に添加し、緩衝液A（10mM NaH₂PO₄・Na₂HPO₄バッファー、pH7.0, 0.1M NaCl含）で洗浄後、この緩衝液Aと緩衝液B（10mM NaH₂PO₄・Na₂HPO₄バッファー、pH7.0, 0.7M NaCl含）を用いて、NaCl濃度0.1Mから0.7Mの濃度勾配溶出を行った。そして、1本鎖hHGFを2本鎖hHGFに変換するプロテアーゼ活性が存在する画分（約300～450mM NaCl画分）を回収した。この画分を、2M硫酸アンモニウムと等量混合後、1M硫酸アンモニウムで平衡化されたPhenyl-sepharoseカラム（ファルマシア社製）に添加した。1M硫酸アンモニウムで洗浄後、硫酸アンモニウム1Mから0Mまでの濃度勾配溶出を行い、1本鎖hHGFを2本鎖hHGFに変換するプロテアーゼ活性が存在する画分（約600～400mM硫酸アンモニウム画分）を回収した。当画分を緩衝液C（300mM NaCl, 50mM Tris/HCl, pH8.0）に一晩透析後、緩衝液Cで平衡化したAprotinin固定化カラム（ペクタファーム社製）に添加した。緩衝液Cで洗浄後、緩

10

10 1本のピークを分取した。このピークを真空状態で乾燥した後、同様にN末端域のアミノ酸配列を分析した。この結果、カルボキシメチル化されたペプチドから得られたN末端アミノ酸配列を含む、等モルの2個のアミノ酸が各位置で検出された。N末端アミノ酸配列を下記に示す。

(X a a は未同定のアミノ酸)

20

されたプロテアーゼ活性を持つ当該タンパク質の見かけ上の分子量を求めるため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。最終的に精製された当該タンパク質を12.5%のポリアクリルアミド・スラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に、非還元下で供した。分子量マーカーとしては、分子量マーカー「第一」III Laemmli法用（第一化学薬品社製）を用いた。電気泳動後、銀染色試薬（関東化学社製）を用いて発色させた。当該タンパク質と標準分子量マーカータンパク質との泳動距離の相対的比較により、ウシ胎児血清由来のタンパク質はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上のみかけの分子量として約38,000ダルトンであり、ヒト血清由来のタンパク質は約34,000ダルトンであった。

30 【0018】実施例5（当該タンパク質の無血清培養への応用）

欧州公開特許第4 1 2 5 5 7号に記載された方法に従って作製されたヒトHGF産生組織をCHO細胞（ 1×10^5 cells/ml）を5%牛胎児血清を含有するe-RDF培地15ml、10cm dish中で、5%CO₂雰囲気下、37℃で培養増殖させた。培養約4日後、コンフルエントな状態に達した時点で、実施例1で得た牛胎児血清を含有するe-RDF培地15ml、10cm dishに

に平衡化したS-Sepharoseカラム（GEヘルスケア社製）に添加した。緩衝液Gで十分に洗浄後、1M NaClを用いた10mM NaH₂PO₄・NaH₂PO₄緩衝液（pH 6.0）で洗脱し、洗脱液を透析管（透析膜：透析管）で透析し、透析液を濃縮し、100%エタノールに沈降させ、乾燥した。

ド・スラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に、還元下で供した。電気泳動後、CBBで染色し、1本鎖hHGFと2本鎖hHGFの割合を比較した。結果を図1に示す。図中、1は当該タンパク質無添加の場合を、2は培地に当該タンパク質を約30ng/ml添加した場合の結果を表わす。

【0019】参考例

一本鎖型組換えhHGF (r-hHGF) 生産方法
培養容器としてT-150フラスコを用いてr-hHGF産生組換えCHO細胞を5%牛胎児血清を含む基本合成培地e-RDF 60ml中、37℃で培養増殖させた。培養約4日後、コンフルエントな状態に達した時点で、血清を含む培養液を除去し、新しいe-RDF培地60mlを添加し、さらに一日培養した。次の日、その培養液を除去し、e-RDF培地60mlで細胞を一度洗浄後、以下の生産培地を添加し、2日間、37℃で培養することにより、一本鎖r-hHGFを産生させた。

【0020】培養後、遠心により細胞を除去した培養上清を回収した。この培養上清より、2本鎖r-hHGF精製と同じ条件にて、S-セファロースカラムにて、一本鎖r-hHGFを精製した。この精製標品は、全r-hHGF量に対して、一本鎖r-hHGFを約90%含

配列

Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu
1 5 8

配列の種類：タンパク質
フラグメント型：N末端フラグメント
(2本鎖の内の1本のN末端フラグメント)
起源：生物名：ヒト、ウシ
組織の種類：血清

【0022】

配列番号：2
配列の長さ：8
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列

Ile Gln Pro Pro Xaa Xaa Gln Ala
1 5 8

(Xaaは未同定のアミノ酸)

配列の種類：タンパク質
フラグメント型：N末端フラグメント
(2本鎖の内の1本のN末端フラグメント)
起源：生物名：ヒト
組織の種類：血清

【0023】

配列番号：3
配列の長さ：8
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列

Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu
1 5 8

hHGFおよび2本鎖hHGFの生成割合を示す図面である。

【図面の簡単な説明】

【図1】：当該タンパク質の添加によるhHGFの生成割合を示す図面である。

んでいた。

生産培地

e-RDF 60ml

この基本合成培地に以下の物を添加

インスリン 10μg/ml

トランスフェリン 10μg/ml

セリナイト 10⁻⁶M

エタノールアミン 10⁻⁵M

アプロチニン 50KIU/ml

10 メルカプトエタノール (6-アミジノ-2ナフチル
p-グアニジノベンゾアートジメタンスルフォネート)
50μM

【0021】〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

フラグメント型：N末端フラグメント

(2本鎖の内の1本のN末端フラグメント)

起源：生物名：ヒト、ウシ

組織の種類：血清

【図1】

